

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. September 2005 (09.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/083103 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12P 19/22**,  
19/14, C08B 30/20, A61K 31/718, C08B 35/00, A61K  
47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002057

(22) Internationales Anmeldedatum:  
26. Februar 2005 (26.02.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 009 783.6  
28. Februar 2004 (28.02.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): SUPRAMOL PARENTAL COLLOIDS  
GMBH [DE/DE]; Industriestr. 1-3, 61191 Rosbach-Rod-  
heim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SOMMERMEYER,  
Klaus [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach v.d.H.  
(DE).

(74) Anwälte: LUDERSCHMIDT, Wolfgang usw.; John-F.-  
Kennedy-Strasse 4, 65189 Wiesbaden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF HYPERBRANCHED POLYSACCHARIDE FRACTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON HYPERVERZWEIGTEN POLYSACCHARID-FRAKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing hyperbranched amylopectin having a mean molecular weight ranging between 2,000 and 29,000 Dalton and an average degree of branching of more than 10 percent and less than 20 percent, said degree of branching being expressed in mole percent of the anhydroglucose units carrying branching points. According to the inventive method, the molecular weight of plant amylopectins or starch rich in amylopectin is reduced to molecular weights not exceeding 60,000 Dalton by means of  $\alpha$ -amylase or acid hydrolysis in a first hydrolysis step, and the molecular weight of the reduced product obtained in the first hydrolysis step is further reduced by means of  $\beta$ -amylase reduction in a second hydrolysis step. The invention further relates to the production of coupling products of the hyperbranched amylopectin with a pharmaceutical agent.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung offenbart ein Verfahren zur Herstellung von hypervverzweigtem Amylopektins mit einem gewichtsgemittelten Molekulargewicht kleiner gleich 29.000 Dalton und grösser gleich 2.000 Dalton und einem mittleren Verzweigungsgrad, ausgedrückt in mol-% der Anhydroglukoseeinheiten, die Verzweigungspunkte tragen, von grösser 10 % und kleiner gleich 20 %, bei dem man in einem ersten Hydrolyseschritt das Molekulargewicht pflanzlicher Amylopektine oder amylopektinreicher Stärke durch  $\alpha$ -Amylase oder Säurehydrolyse auf Molekulargewichte kleiner gleich 60.000 Dalton abbaut, und in einem zweiten Hydrolyseschritt das Molekulargewicht des Abbauprodukts aus dem ersten Hydrolyseschritt durch einen  $\beta$ -Amylase-Abbau weiter abbaut, sowie die Herstellung von Kopplungsprodukten des hypervverzweigten Amylopektins mit einem pharmazeutischen Wirkstoff.



WO 2005/083103 A1

## Verfahren zur Herstellung von hyperverzweigten Polysaccharid-Fraktionen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von hyperverzweigtem Amylopektin und ein Verfahren zur Herstellung von Kopplungsprodukten eines hyperverzweigten Amylopektins mit pharmazeutischen Wirkstoffen.

Es hat sich gezeigt, dass durch die Kopplung von hydrophilen Polymeren an pharmazeutische Wirkstoffe, die parenteral appliziert werden, deren Nebenwirkungen reduziert werden können. Insbesondere können durch Vergrößerung des Molekulargewichts dieser Wirkstoffe renale Nebenwirkungen reduziert oder sogar vermieden werden, wenn die Molekülgröße der Kopplungsprodukte über der Ausschlussgrenze der Niere, die wie ein Filter wirkt, liegt. Die Molekülgröße des Kopplungsprodukts wird dabei durch das passend ausgewählte Molekulargewicht des Polymers eingestellt.

Ein weiterer Vorteil eines Kopplungsprodukts aus hydrophilem Polymer und pharmazeutischem Wirkstoff ist, dass die Antigenizität von therapeutischen Proteinen herabgesetzt wird, und dadurch die diesbezüglichen Nebenwirkungen reduziert oder vermieden werden können.

Ebenso können durch solche Kopplungsprodukte die pharmakokinetischen Halbwertszeiten und damit die Verweilzeiten der pharmazeutischen Wirkstoffe im Serum des Patienten erheblich verlängert werden. Dies ermöglicht eine erhebliche Ausdehnung der Therapieintervalle bei der parenteralen Applikation.

Polymere, die sich zur oben beschriebenen Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe eignen, sind vor allem Polyethylenglykole [Herman, S. et.al., Poly(Ethylene Glycol) with Reactive Endgroups: I. Modification of Proteins, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 10. (1995) 145-187] oder auch Polysaccharide, beispielsweise Stärkederivate und. Dextrane. Nach entsprechender Aktivierung erfolgt die Kopplung an die Wirkstoffe.

Die Wirkstoffe werden dabei nach an sich bekannten chemischen Verfahren, die schon aus der Technik der Immobilisierung von Liganden an Festphasen oder aus der Chemie der Proteinkopplung bzw. Vernetzung bekannt sind, an die Trägermoleküle gekoppelt. Entsprechende Verfahren sind in G.T. Hermanson et.al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press Inc. (1992) bzw. in S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press LLC (1993) und C.P. Stowell et.al., Neoglycoproteins, the preparation and application of synthetic Glycoprotein, In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 37 (1980), 225-281, beschrieben.

Nachteile der Polyethylenglykole gegenüber den Stärkederivaten ist dabei, dass diese im Körper nicht ohne weiteres metabolisierbar sind, während die Stärkederivate durch körpereigene Serum- $\alpha$ -Amylase abbaubar sind. Durch geeignete Substitution der Stärkederivate, z.B. mit Hydroxyethylgruppen, kann der Abbau im Körper gezielt verzögert werden, woraus eine maßgeschneiderte Kinetik der parenteral applizierbaren Wirkstoffkonjugate erreicht werden kann [K. Sommermeyer et.al., Krankenhauspharmazie, 8. Jahrgang Nr. 8, (1987)].

Nachteilig an der Derivatisierung von Stärke mit Hydroxygruppen ist jedoch, dass herstellungsbedingt die Verteilung der Hydroxyethylgruppen entlang der Kette uneinheitlich ist, wodurch sich aufgrund der regional hohen Substitutionsgrade an bestimmten Stellen der Kohlehydratkette beim Abbau im Körper Fragmente bilden, die durch Körperenzyme nicht weiter abgebaut werden können. Diese Fraktionen bilden die sogenannten Speicherfraktionen [P. Lawin, et.al., Hydroxyethylstärke, Eine aktuelle Übersicht, Georg Thieme Verlag (1989)].

In DE 102 17 994 werden hyperverzweigte Polysacharide zur Kopplung an pharmakologische Wirkstoffe beschrieben. Diese offenbarten, hyperverzweigten Amylopektine weisen eine dem körpereigene Glykogen ähnliche Struktur auf und sind daher äußerst verträglich und im Körper vollständig abbaubar. Durch Einstellung der Verzweigungsgrade lässt sich die Abbaukinetik der hyperverzweigten Amylopektine so einstellen, dass auch ohne weitere Derivatisierung die gewünschten Verweilzeiten im Serum erreicht werden können.

Bezüglich der Herstellung dieser hyperverzweigten Amylopektine verweist DE 102 17 994 auf EP 1 369 432. EP 1 369 432 offenbart lösliche, hyperverzweigte Glucosepolymere mit einem Anteil der  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Bindungen > 10 %, vorzugsweise zwischen 12 und 30 % und einem Molekulargewicht zwischen 35.000 und 200.000 Dalton. Nach EP 1 369 432 werden diese Polymere hergestellt, indem eine wässrige Stärkesuspension oder Stärkelösung zur Erhöhung des Verzweigungsgrads mit einem Verzweigungsenzym behandelt wird und anschließend mit einem Enzym, ausgewählt aus der Gruppe aus  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase, Anhydroglucosidase und  $\alpha$ -Transglucosidase hydrolysiert wird. Das dazu nötige Verzweigungsenzym wird aus Organismen und / oder Mikroorganismen extrahiert und ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycogenverzweigungsenzymen, Stärkeverzweigungsenzymen und Mischungen dieser Enzyme.

Nachteilig an dem in EP 1 369 432 beschriebenen Verfahren ist, dass es aufwendig und teuer ist. Insbesondere der Einsatz von zurzeit nicht kommerziell erhältlichen Verzweigungsenzymen bedeutet, dass diese jeweils extra aus Organismen und / oder Mikroorganismen isoliert werden müssen.

Somit ist es Aufgaben der Erfindung, ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Herstellung von hypervverzweigten Polysacchariden zu liefern, die als Trägermoleküle für pharmazeutische Wirkstoffe verwendet werden können.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Verfahren nach Anspruch 1 diese Aufgabe löst. Dabei werden in einem ersten Hydrolyseschritt pflanzliche Amylopektine oder amylopektinreicher Stärken durch  $\alpha$ -Amylase oder Säurehydrolyse auf Molekulargewichte kleiner gleich 60.000 Dalton abbaut, und einen zweiten Hydrolyseschritt das Molekulargewicht des Abbauprodukts aus dem ersten Schritt durch einen  $\beta$ -Amylase-Abbau weiter abgebaut.

Weiter wurde gefunden, dass durch die Säurehydrolyse von Amylopektin oder amylopektinreicher Stärken auf gewichtsgemittelte Molekulargewichte kleiner gleich 60.000 eine deutliche Erhöhung des Verzweigungsgrads erhalten werden konnte.

Ein solches hypervverzweigtes Amylopektin entsprechend der gegenwärtigen Erfindung hat vorzugsweise ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht  $\geq 2.000$  Dalton sowie einen Verzweigungsgrad  $\geq 10\%$ . Besonders bevorzugt ist ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht  $\geq 2.000$  Dalton und  $\leq 29.000$  Dalton und ein Verzweigungsgrad  $\geq 10\%$  und  $\leq 20\%$ .

Unter Amylopektinen versteht man dabei zunächst ganz allgemein verzweigte Stärken oder Stärkeprodukte mit  $\alpha$ -(1-4)- und  $\alpha$ -(1-6)-Bindungen zwischen den Anhydroglucoseeinheiten. Die Verzweigungen der Ketten erfolgen dabei über die  $\alpha$ -(1-6)-Bindungen. Diese Verzweigungsstellen sind bei natürlich vorkommenden Amylopektinen etwa alle 15 bis 30 Glucoseelemente unregelmäßig vorhanden. Das Molekulargewicht von natürlichen Amylopektin liegt sehr hoch im Bereich von  $10^7$  bis  $2 \times 10^8$  Dalton. Man geht davon aus, dass auch Amylopektin in gewissen Grenzen Helices bildet.

Man kann für Amylopektine einen Verzweigungsgrad definieren. Das Maß für die Verzweigung ist das Verhältnis der Zahl von Anhydroglucoseeinheiten, die Verzweigungspunkte [ $\alpha$ -(1-6)-Bindungen] tragen, zur Gesamtzahl der Anhydroglucoseeinheiten des Amylopektins. Dieses Verhältnis wird in mol-% ausgedrückt. In der Natur auftretendes Amylopektin weist Verzweigungsgrade von ca. 4 mol-% auf. Hyperverzweigte Amylopektine weisen eine gegenüber den in der Natur vorkommenden Verzweigungsgraden deutlich erhöhte Verzweigungsgrade auf. Dabei handelt es sich beim Verzweigungsgrad in jedem Fall um einen Mittelwert (mittlerer Verzweigungsgrad), da Amylopektine polydisperse Substanzen sind.

Im Rahmen dieser Erfindung soll unter hyperverzweigten Amylopektinen Amylopektine mit einem mittleren Verzweigungsgrad von größer gleich 10 mol % verstanden werden.

Baut man pflanzliche Amylopektine oder amylopektinreiche Stärken mit  $\alpha$ -Amylase oder Säurehydrolyse ab, erhält man, in Abhängigkeit des jeweiligen Hydrolysegrades der Hydrolyseprodukte, Amylopektine mit einem jeweils ähnlichen Verzweigungsgrad. Dabei ist der säurehydrolytische Abbau gegenüber dem enzymatischen Abbau mit  $\alpha$ -Amylase einfacher durchzuführen und billiger. Weiter ist es bei der Säurehydrolyse möglich, den Hydrolysegrad während des Hydrolyseprozesses durch Inprozess-HPGPC zu verfolgen und den Hydrolysegrad gezielt einzustellen. Somit ist der säurehydrolytische Abbau gegenüber dem Abbau mit  $\alpha$ -Amylase besonders bevorzugt.

Durch die Behandlung der im ersten Hydrolyseschritt erhaltenen Produkte mit  $\beta$ -Amylase werden diese selektiv an den  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Anhydroglucoseeinheiten abgebaut. Bei diesem Abbau werden die Maltoseeinheiten an den äußeren, nicht reduzierenden Kettenenden abgespalten, ohne dass die  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verzweigungen selbst gelöst werden. Der Abbau erfolgt dabei vom äußeren Kettenende bis auf etwa 2 Glucoseeinheiten vor der ersten auftretenden Verzweigungsstelle. Dadurch werden die sogenannten

$\beta$ -Genzdextrine erhalten, worin die 1,6-glycosidischen Bindungen des Amylopektins angereichert sind und dadurch der Verzweigungsgrad erhöht ist.

Im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung können alle amylopektinhaltigen Stärken als Ausgangsmaterial verwendet werden. Besonders bevorzugt sind dabei Wachsmaisstärke und Tapiokastärke.

Aufgrund des hohen Verzweigungsgrades werden die  $\beta$ -Genzdextrine im Serum entsprechend langsam abgebaut, da dort zum Abbau von Polysacchariden die  $\alpha$ -Amylase vorherrscht. Die Produkte aus dem erfindungsgemäßen Verfahren eignen sich daher für die Kopplung mit pharmazeutischen Wirkstoffen.

Die Parameter Verzweigungsgrad und Molekulargewicht des Amylopektins gestatten eine zielgerichtete Beeinflussung und somit Einstellung einer gewünschten Pharmakokinetik, insbesondere das Erreichen eines gewünschten  $\alpha$ -Amylase-Abbaus. Dem Verzweigungsgrad des Amylopektins kommt hierbei eine Schlüsselfunktion zu, aber auch das Molekulargewicht hat einen Einfluss auf die angesprochene Kinetik. Daneben kann es auch durch die Verteilung der Verzweigungsprodukte gelingen, die Kinetik des Abbaus des Amylopektins in eine gewünschte Richtung zu beeinflussen.

Vorzugsweise werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nach dem ersten Hydrolyseschritt und/oder nach den zweiten Hydrolyseschritt niedermolekulare Verunreinigungen mit einem absoluten Molekulargewicht  $< 5.000$  Dalton, vorzugsweise  $< 1.000$  abgetrennt. Diese Abtrennung erfolgt vorzugsweise durch Ultrafiltration, wobei Membranen mit einem cut off von  $5.000$  Dalton bzw.  $1.000$  Dalton verwendet werden. Bei den abgetrennten Verunreinigungen handelt es sich hauptsächlich um niedermolekulare Abbauprodukte des Amylopektins bzw. der Stärke sowie um Salzsäure.

Die Isolierung des erfindungsgemäß abgebauten Produkts erfolgt vorzugsweise durch Gefriertrocknung.

$\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase sind kommerziell erhältliche, kostengünstige Enzyme. Daher ist eine Hydrolyse mit diesen Molekülen einfach und kostengünstig durchzuführen. Gleiches gilt für die Säurehydrolyse. Auch die Aufarbeitung durch Ultrafiltration und Gefriertrocknung ist einfach und nicht teuer. Daher sind die erfindungsgemäßen Produkte einfach und kostengünstig herzustellen.

Vorzugsweise wird das Hydrolyseprodukt des zweiten Hydrolyseschritts mit einem pharmazeutischen Wirkstoff gekoppelt. Bei dem pharmazeutischen Wirkstoff handelt es sich vorzugsweise um ein Protein oder ein Polypeptid.

Die Kopplung des erfindungsgemäß hergestellten hypervverzweigten Amylopektins an den pharmazeutischen Wirkstoff kann dabei auf jede bekannte Art erfolgen. Solche Kopplungen eines pharmazeutischen Wirkstoffs an ein Polysaccharid sind beispielsweise in WO 02/08 0979, PCT/EP 02/06 764, WO 03/07 4088, WO 03/07 4087, PCT/EP 03/13 622, DE 102 54 754.9 und PCT/EP 04/00 488 beschrieben.

Vorzugsweise erfolgt die Kopplung von Seiten des pharmazeutischen Wirkstoffs über eine freie Aminofunktion an die Anhydroglucose-Einheiten des reduzierenden Kettenendes des hypervverzweigten Amylopektins. Besonders bevorzugt wird dazu das reduzierende Ende des hypervverzweigten Amylopektins aktiviert. Besonders bevorzugt ist es dabei, das reduzierende Ende des hypervverzweigten Amylopektins zur Aldonsäure zu oxidieren, die Aldonsäuregruppe zur Aldonsäure-Estergruppe zu aktivieren und den pharmazeutischen Wirkstoff über die Aldonsäure-Estergruppe an das hypervverzweigte Amylopektin zu koppeln. Ebenso ist es bevorzugt, das erfindungsgemäß hergestellte Produkt in wasserfreiem Medium mit einem Kohlensäurediester zu einem Kohlensäurediester des hypervverzweigten Amylopektins umzusetzen und diesen an den Wirkstoff zu koppeln.



Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und Vergleichsbeispielen genauer erläutert, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele beschränkt werden soll.

#### Messverfahren

Das Molekulargewicht und das gewichtsgemittelte Molekulargewicht wurde mit üblichen Verfahren bestimmt. Hierzu gehören beispielweise wässrige GPC, HPGPC, HPLC, Lichtstreuung und der gleichen.

Der Verzweigungsgrad wurde anhand von  $^1\text{H}$  NMR bestimmt.

#### Beispiel 1

55 g dünnkochende Wachsmaisstärke wurde in 1.000 ml entionisiertem Wasser suspendiert und die Suspension unter Rückfluss zum Sieden gebracht. Dabei löste sich die Wachsmaisstärke vollständig auf. Nach dem Lösen wurde der pH-Wert mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 2,0 gebracht und der Ansatz eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit einer Membran von einem nominellen cut off von 5.000 Dalton gegen entionisiertes Wasser ultrafiltriert. Die so gereinigte Substanz wurde durch Gefriertrocknung isoliert. Die Ausbeute betrug 60 %. Die Charakterisierung der Substanz ergab ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von 42.000 Dalton (gemessen mit HPGPC) sowie einen Verzweigungsgrad von 7 mol % (gemessen mit  $^1\text{H}$  NMR).

#### Beispiel 2

10 g der Wachsmaisstärke Abbaufraction aus Beispiel 1 wurden in 1.000 ml 0,15 molarem Acetatpuffer, pH 4,2, gelöst und mit 10 Einheiten/ml  $\beta$ -Amylase (Firma Sigma;  $\beta$ -Amylase Typ I-B from sweet potato, Art.-Nr. A7005) versetzt. Der Ansatz wurde bei 25 °C 12 Stunden reagieren lassen. Anschließend wurde das Enzym durch 10 minütiges Kochen des Ansatzes bei 100 °C inaktiviert. Nach dem Abkühlen wurden der Reaktionsmischung ca. 2 Gew. % Aktivkohle

(bezogen auf das Substrat) zugegeben und abfiltriert. Anschließend wurde zur Entfernung der Maltose und des Puffers das Reaktionsprodukt unter Verwendung einer Membran mit einem cut off von 1.000 Dalton ultrafiltriert und das  $\beta$ -Genzdextrin durch Gefriertrocknung isoliert. Die Ausbeute betrug 60 %. Die Charakterisierung ergab einen Verzweigungsgrad von 14 mol % (gemessen mit  $^1\text{H}$  NMR) sowie ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von 28.000 Dalton.

### Beispiel 3

Beispiel 3 wurde analog zu Beispiel 1 durchgeführt, wobei die Hydrolysezeit auf 4 Stunden verlängert wurde. Dabei wurde das Hydrolyseverfahren durch Inprozess-HPGPC verfolgt, um ein Produkt mit einem gewichtsgemittelten Molekulargewicht < 15.000 Dalton zu erhalten. Die Reinigung mittels Ultrafiltration folgte im Gegensatz zu Beispiel 1 mit Hilfe einer Membran mit einem nominellen cut off von 1.000 Dalton. Die Ausbeute betrug 25 %. Die Charakterisierung der Substanz ergab ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von 10.000 Dalton sowie einen Verzweigungsgrad von 10,3 mol %.

### Beispiel 4

Die Herstellung des  $\beta$ -Genzdextrins erfolgte analog zu Beispiel 2, wobei das Hydrolyseprodukt aus Beispiel 3 verwendet wurde. Die Ausbeute betrug 60 %. Die Charakterisierung der Substanz ergab ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von 7.000 Dalton sowie einen Verzweigungsgrad von 15 mol %.

### Beispiel 5

55 g native Tapioka-Stärke wurden in 1.000 ml entionisierten Wasser unter Rückfluss in der Hitze verkleistert. Danach wurden 11 ml 1 N HCl zum Einstellen eines pH-Werts von ca. 1,9 zugegeben. Nach 30 Minuten wurde das Gel dünnflüssig und der Ansatz wurde weitere 7 Stunden unter Rückfluss erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurde vom Niederschlag und der Trübung abfiltriert und gegen entionisiertes Wasser mit einer Membran mit nominellen cut off von 1.000 Dalton ultrafiltriert. Die Ausbeute betrug 24,4 %. Die Charakterisierung der Substanz ergab ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von 10.000 Dalton und einen Verzweigungsgrad von 9,6 mol %.

#### Beispiel 6

Die Herstellung des  $\beta$ -Genzdextrins erfolgte analog zu Beispiel 2, mit dem Unterschied, dass die Hydrolysesubstanz aus Beispiel 5 eingesetzt wurde. Die Ausbeute betrug 55 %. Die Charakterisierung der Substanz ergab ein gewichtsgemitteltes Molekulargewicht von 5.000 Dalton sowie einen Verzweigungsgrad von 16 mol %.

#### Beispiel 7

Die Wachsmaisstärkeabbaufraktion aus Beispiel 2 wurde in isotonem Phosphatpuffer pH 7,2 gelöst, so dass eine 1 Gew. % Lösung erhalten wurde. Die Lösung wurde auf 37,0 ° C erwärmt und 0,5 I.E./ml  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepancreas (Firma Roche; AS, Art.-Nr. 102 814) zugegeben. Nach jeweils 1 und 3 Stunden wurden Proben entnommen, das Enzym durch Hitze inaktiviert und das Molekulargewicht der verbleibenden höhermolekularen Fraktion durch HPGPC bestimmt. Dabei betrug das gewichtsgemittelte Ausgangsmolekulargewicht 28.000 Dalton, das gewichtsgemittelte Molekulargewicht nach 1 Stunde Hydrolyse 11.000 Dalton und das gewichtsgemittelte Molekulargewicht nach 3 Stunden Hydrolyse 7.000 Dalton.

#### Beispiel 8

Das Verfahren aus Beispiel 7 wurde wiederholt, wobei die Abbaufraction aus Beispiel 4 eingesetzt wurde. Dabei betrug das Gewichtsmittel des Ausgangsmolekulargewicht 7.000 Dalton, das gewichtsgemittelte

Molekulargewicht nach 1 Stunde Hydrolyse 5.500 Dalton und das gewichtsgemitteltes Molekulargewicht nach 3 Stunden Hydrolyse 4.600 Dalton.

#### Vergleichsversuch 1

Vergleichsversuch 1 wurde analog zu Beispiel 7 durchgeführt, wobei anstelle der Abbaufraktion aus Beispiel 2 handelsübliche Hydroxyethylstärke (130/0,4, Handelsname „Voluven“) eingesetzt wurde. Das Gewichtsmittel des Ausgangsmolekulargewicht betrug 140.200 Dalton, das gewichtsgemitteltes Molekulargewicht nach 1 Stunde betrug 54.700 Dalton. Das gewichtsgemitteltes Molekulargewicht nach 3 Stunden Hydrolyse betrug 33.700 Dalton.

Damit ist die Abbaugeschwindigkeit des handelsüblichen Plasmaexpanders auf Basis von Hydroxyethylstärke mit  $\alpha$ -Amylase aus Vergleichsversuch 1 vergleichbar mit der Abbaugeschwindigkeit der hypervverzweigten Amylopektinfraktion aus Beispiel 7.

#### Beispiel 9

Oxidation der hypervverzweigten Amylopektinfraktion aus Beispiel 4 an der reduzierenden Endgruppe zur Aldonsäure.

Aus der nach Beispiel 4 hergestellten, hypervverzweigten Abbaufraktion wurde eine 25 Gew. %-ige Lösung in entionisiertem Wasser hergestellt. Zu dieser Lösung wurde ein 3,5-facher, molarer Überschuss, bezogen auf die reduzierende Endgruppe, einer 0,05 molaren Iodlösung portionsweise langsam zugegeben und jeweils mit 0,1 N NaOH (3-fache molare Menge, bezogen auf Iod) portionsweise entfernt. Nach Zugabe wurde über Nacht bei Raumtemperatur weiter reagieren lassen und die erhaltene Lösung anschließend mit einer Membran mit nominellen cut off von 1.000 Dalton dialysiert, wobei der pH überwacht wurde. Nach Erreichens eines pH-Werts im Dialysat von etwa 6 und Überprüfung auf Iodidfreiheit durch zusetzen von Natriumiodat und Ansäuern wurde der Ansatz mit 0,1 N HCl auf pH 2,5 eingestellt und solange weiter dialysiert, bis das

Ultrafiltrat einen pH von 5 aufwies. Das Produkt wurde durch Gefriertrocknung isoliert. Die Ausbeute betrug 80 % der theoretischen Ausbeute. Der Oxidationsgrad betrug > 90 % und wurde über die reduzierende Endgruppe bestimmt.

#### Beispiel 10

66 mg Aldonsäure aus Beispiel 9 wurden in 0,5 ml trockenem DMF gelöst und mit 3,4 mg NN'-Disuccinimidylcarbonat versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur reagieren lassen. 0,5 ml einer 1 Gew. %-igen Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA) wurden mit 180 ml einer 1 molaren Bicarbonatlösung versetzt und anschließend wurden 2 Portionen von jeweils 100 µl der aktivierten Aldonsäure tropfenweise zur BSA-Lösung zugefügt und jeweils eine halbe Stunde ausreagieren lassen. Danach wurde der Ansatz mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Untersuchung der Reaktionslösung mittels HPGPC ergab eine Ausbeute an Kopplungsprodukt von > 95 % des eingesetzten BSA's.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von hyperverzweigtem Amylopektin mit einem gewichtsgemittelten Molekulargewicht größer gleich 2.000 Dalton und kleiner gleich 30.000 und einem mittleren Verzweigungsgrad, ausgedrückt in mol-% der Anhydroglukoseeinheiten, die Verzweigungspunkte tragen, von größer 10 % und kleiner gleich 20 %, bei dem man in einem ersten Hydrolyseschritt das Molekulargewicht pflanzlicher Amylopektine oder amylopektinreicher Stärke durch  $\alpha$ -Amylase oder Säurehydrolyse auf Molekulargewichte kleiner gleich 60.000 Dalton abbaut, und in einem zweiten Hydrolyseschritt das Molekulargewicht des Abbauprodukts aus dem ersten Hydrolyseschritt durch einen  $\beta$ -Amylase-Abbau weiter abbaut.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem man nach dem ersten Hydrolyseschritt und / oder nach dem zweiten Hydrolyseschritt niedermolekulare Verunreinigungen mit einem absoluten Molekulargewicht kleiner 5.000 Dalton, vorzugsweise kleiner 1.000 Dalton, abtrennt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass im ersten Hydrolyseschritt das Molekulargewicht pflanzlicher Amylopektine oder amylopektinreicher Stärke durch Säurehydrolyse abgebaut wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Hydrolyseprodukt des zweiten Hydrolyseschritts mit einem pharmazeutischen Wirkstoff gekoppelt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmazeutische Wirkstoff ein Protein oder ein Polypeptid ist.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplung des Hydrolyseprodukts des zweiten Hydrolyseschritts mit dem pharmazeutischen Wirkstoff an die terminale Anhydroglucoseeinheit des Hydrolyseprodukts erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die terminale reduzierende Endgruppe des Hydrolyseprodukts des zweiten Hydrolyseschritts zur Aldonsäure oxidiert wird, diese Aldonsäuregruppe zur Aldonsäure-Estergruppe aktiviert wird und mit dem pharmazeutischen Wirkstoff gekoppelt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplung des Hydrolyseprodukts des zweiten Hydrolyseschritts mit dem pharmazeutischen Wirkstoff über eine Kohlensäureestergruppe erfolgt.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/002057

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P19/22 C12P19/14 C08B30/20 A61K31/718 C08B35/00  
A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/014961 A1 (BACKER DANIEL ET AL) 22 January 2004 (2004-01-22) abstract; claim 7 paragraph '0121! paragraph '0122! paragraph '0130! - paragraph '0134!	1-8
Y	US 5 886 168 A (BRUMM ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) abstract; claims 1,8	1-8
A	GB 2 342 656 A (* ML LABORATORIES PLC; * N M ROTHSCHILDS & SONS LIMITED; * M L LABORAT) 19 April 2000 (2000-04-19) abstract; claims	1-8
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2005

Date of mailing of the international search report

06/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, O



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/002057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 102 17 994 A1 (SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS GMBH) 6 November 2003 (2003-11-06) cited in the application the whole document -----	1-8
A	US 2001/046690 A1 (ANTRIM RICHARD L ET AL) 29 November 2001 (2001-11-29) examples 2,3 -----	1-8
A	US 5 753 468 A (HENLEY ET AL) 19 May 1998 (1998-05-19) abstract; claims 1,2,7 column 2, line 4 - line 13 -----	1-8
P,A	WO 2004/050710 A (SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS GMBH; SOMMERMEYER, KLAUS) 17 June 2004 (2004-06-17) cited in the application abstract; claims -----	4-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002057

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004014961	A1	22-01-2004	FR 2840612 A1 CA 2430557 A1 CN 1468867 A EP 1369432 A2 JP 2004161998 A	12-12-2003 06-12-2003 21-01-2004 10-12-2003 10-06-2004
US 5886168	A	23-03-1999	US 5612202 A AU 665122 B2 AU 5032393 A CA 2109368 A1 JP 6209784 A MX 9306734 A1 NZ 250048 A ZA 9308067 A	18-03-1997 14-12-1995 12-05-1994 29-04-1994 02-08-1994 30-06-1994 26-10-1994 01-09-1994
GB 2342656	A	19-04-2000	NONE	
DE 10217994	A1	06-11-2003	NONE	
US 2001046690	A1	29-11-2001	US 2003134394 A1 US 2004092732 A1 AU 4333601 A AU 4333801 A BR 0104706 A CA 2368501 A1 EP 1196621 A2 MX PA01010889 A WO 0164933 A2 WO 0164934 A2 US 2003113876 A1 US 2002012973 A1	17-07-2003 13-05-2004 12-09-2001 12-09-2001 15-01-2002 07-09-2001 17-04-2002 21-06-2002 07-09-2001 07-09-2001 19-06-2003 31-01-2002
US 5753468	A	19-05-1998	NONE	
WO 2004050710	A	17-06-2004	DE 10256558 A1 AU 2003288218 A1 WO 2004050710 A2	16-09-2004 23-06-2004 17-06-2004

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002057

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12P19/22 C12P19/14 C08B30/20 A61K31/718 C08B35/00  
A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 2004/014961 A1 (BACKER DANIEL ET AL) 22. Januar 2004 (2004-01-22) Zusammenfassung; Anspruch 7 Absatz '0121! Absatz '0122! Absatz '0130! - Absatz '0134! -----	1-8
Y	US 5 886 168 A (BRUMM ET AL) 23. März 1999 (1999-03-23) Zusammenfassung; Ansprüche 1,8 -----	1-8
A	GB 2 342 656 A (* ML LABORATORIES PLC; * N M ROTHSCILDS & SONS LIMITED; * M L LABORAT) 19. April 2000 (2000-04-19) Zusammenfassung; Ansprüche ----- -/--	1-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/07/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ceder, O

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/002057

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 102 17 994 A1 (SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS GMBH) 6. November 2003 (2003-11-06) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-8
A	US 2001/046690 A1 (ANTRIM RICHARD L ET AL) 29. November 2001 (2001-11-29) Beispiele 2,3 -----	1-8
A	US 5 753 468 A (HENLEY ET AL) 19. Mai 1998 (1998-05-19) Zusammenfassung; Ansprüche 1,2,7 Spalte 2, Zeile 4 - Zeile 13 -----	1-8
P,A	WO 2004/050710 A (SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS GMBH; SOMMERMEYER, KLAUS) 17. Juni 2004 (2004-06-17) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Ansprüche -----	4-8

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002057

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2004014961 A1	22-01-2004	FR 2840612 A1	12-12-2003
		CA 2430557 A1	06-12-2003
		CN 1468867 A	21-01-2004
		EP 1369432 A2	10-12-2003
		JP 2004161998 A	10-06-2004
US 5886168 A	23-03-1999	US 5612202 A	18-03-1997
		AU 665122 B2	14-12-1995
		AU 5032393 A	12-05-1994
		CA 2109368 A1	29-04-1994
		JP 6209784 A	02-08-1994
		MX 9306734 A1	30-06-1994
		NZ 250048 A	26-10-1994
		ZA 9308067 A	01-09-1994
GB 2342656 A	19-04-2000	KEINE	
DE 10217994 A1	06-11-2003	KEINE	
US 2001046690 A1	29-11-2001	US 2003134394 A1	17-07-2003
		US 2004092732 A1	13-05-2004
		AU 4333601 A	12-09-2001
		AU 4333801 A	12-09-2001
		BR 0104706 A	15-01-2002
		CA 2368501 A1	07-09-2001
		EP 1196621 A2	17-04-2002
		MX PA01010889 A	21-06-2002
		WO 0164933 A2	07-09-2001
		WO 0164934 A2	07-09-2001
		US 2003113876 A1	19-06-2003
		US 2002012973 A1	31-01-2002
US 5753468 A	19-05-1998	KEINE	
WO 2004050710 A	17-06-2004	DE 10256558 A1	16-09-2004
		AU 2003288218 A1	23-06-2004
		WO 2004050710 A2	17-06-2004